β-甘露聚糖酶基因和木聚糖酶基因在毕赤酵母中的共表达

李剑芳[1]，赵顺阁[1]，邬敏辰[*2]，张慧敏[1]，魏喜焕[1]
（1. 江南大学 食品学院，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 医药学院，江苏 无锡 214122）

摘要：为实现β-甘露聚糖酶基因和木聚糖酶基因在毕赤酵母中的共表达，作者将经 *Sal* Ⅰ线性化的 pPIC9K-*xyn*Ⅱ电转化至工程菌 GS115/*Δnman5A* 中，经 G418 浓度梯度筛选后获得能同时高产β-甘露聚糖酶和木聚糖酶的双重重组子 GS115/*Δnman5A*-*xyn*Ⅱ。SDS-PAGE 显示目的蛋白的相对分子质量分别约为 52 000，24 100。摇瓶发酵筛选出产酶活性最强的转化株，命名为 GSMX2，随后对该菌株的表达条件进行初步优化，优化后的表达条件为：诱导时间 120 h，培养基起始 pH 值为 7.0，甘油添加量为 1.5%，甲醇添加量为 1.5%。在此培养条件下，产β-甘露聚糖酶和木聚糖酶的活性分别达到 37.1 U/mL 和 193.6 U/mL。

关键词：β-甘露聚糖酶；木聚糖酶；共表达；条件优化
中图分类号：S 37　**文献标志码**：A　**文章编号**：1673—1689(2012)011—1136—06

Coexpression of β-mannanase Gene and Xylanase Gene in *Pichia pastoris*

LI Jian-fang[1]，*ZHAO Shun-ge*[1]，*WU Min-chen*[*2]，*ZHANG Hui-min*[1]，*WEI Xi-huan*[1]
(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Medicine and Pharmaceutics, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: β-mannanase and xylanase are extensively used in food industry. Synergistic action between the two enzymes is obersved to effectively improve digestibility of the hemicelluloses of food material. In order to coexpress β-mannanase gene and xylanase gene in *Pichia pastoris*, pPIC9K-*xyn*Ⅱ was linearized with *Sal I* and transformed into GS115/*Δnman5A* by electroporation. GS115/*Δnman5A*-*xyn*Ⅱ with high production of β-mannanase and xylanase was screened by using G418. SDS-PAGE demonstrated two protein bands with apparent molecular weight of about 52 000 and 24 100. One GS115/Anman5A-*xyn*Ⅱ transformant producing the highest activities of two enzymes in shake flasks was selected and numbered as GSMX2. Subsequently the expression conditions for enzymes production by using GSMX2 were optimized, the optimum expression conditions listede as follows: initial pH 7.0, glycerol concentration 1.5%, methanol concentration

收稿日期：2012-04-06
基金项目：国家自然科学基金项目(31271811)；2011 年高校博士研究生科研创新计划项目(JUDCF10056)。
作者简介：李剑芳(1965—)，女，江苏无锡人，工学博士，副教授，主要从事食品生物技术研究。E-mail：lijf@163.com
*通信作者：邬敏辰(1962—)，男，江苏无锡人，理学博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程与基因工程研究。E-mail：bioch@163.com

1.5%, induction for 120 h. Under these conditions, the activities of β-mannanase and xylanase were achieved at 37.1 U/mL and 193.6 U/mL, respectively.

Keywords: β-mannanase, xylanase, coexpression, optimization

β-1,4-D-甘露聚糖酶(EC 3.2.1.78)和 β-1,4-D-木聚糖酶(EC 3.2.1.8)均属于半纤维素酶，分别水解半纤维素中的 β-1,4-甘露糖苷键和 β-1,4-木糖苷键。两种酶在食品加工、动物饲料加工、生物漂白、生物能源等工业领域有着重要作用[1-2]。另外，当两种酶联合使用时可以大大提高半纤维素成分的水解效率[3]。在食品加工中，两种酶主要应用于功能性低聚糖的生产，果蔬汁和果酒的澄清、植物油的生产及咖啡的提取等，其中功能性低聚糖作为新型的食品添加剂，在促进双歧杆菌等肠道益生菌繁殖、提高机体免疫力等方面具有显著的生理功能。

pPIC9K 和 pPICZαA 质粒同属于毕赤酵母分泌型表达质粒，可以通过不同的整合位点和抗性标记实现在同一宿主中的整合与筛选，这在一定程度上可以简单、高效地实现多个基因在毕赤酵母中的共表达。吴振芳等构建出了能同时表达植酸酶和内切葡聚糖酶的重组毕赤酵母，共表达产物中两种酶的酶活分别为 13 726.7 U/mL 和 364.5 U/mL[4]。作者所在课题组前期研究中，周晨妍等成功地克隆了宇佐美曲霉 E001 木聚糖酶基因(*xyn* II)，并在不同毕赤酵母中实现了高水平的表达[5-6]；本文作者亦成功克隆出黑曲霉 LW-1 的甘露聚糖酶基因(*Anman5A*)，并电转化至毕赤酵母中成功表达[7]。在上述研究的基础上，本研究利用双质粒体系首次实现 *Anman5A* 和 *xyn* II 在毕赤酵母中的共表达，并对工程菌的摇瓶发酵条件进行了优化，为酶制剂生产成本的降低和功能性低聚糖的制备等研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

E. coli DH5α/pPIC9K -*xyn* II 与 GS115/*Anman5A* 均为江南大学医药学院分子生物学实验室构建保存；*rTaq* 酶、*Sal* I 和 250 bp DNA Ladder Marker 购于 TaKaRa 公司；Tryptone、Yeast Extract、YNB、G418 和 EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit 购自上海生工；角豆胶、桦木木聚糖购于 Sigma 公司；其他试剂均为国产或进口分析纯。

1.2 培养基

LB、YPD、MD、BMGY 和 BMMY 培养基的配制参见 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit 操作手册，2×BMGY 培养基（根据实验所需选择不同的起始 pH 和甘油添加量）用作基础发酵培养基。

1.3 毕赤酵母 GS115/*Anman5A* 的二次转化、筛选及鉴定

将 *E. coli* DH5α/pPIC9K -*xyn* II 和 *E. coli* DH5α/pPIC9K 在 LB 培养基上活化后，用 EZ-10 Spin Column Plasmid Mini-Preps Kit 提取 pPIC9K-*xyn* II 和 pPIC9K 质粒。两种质粒经 *Sal* I 线性化后，用电穿孔法分别将其导入毕赤酵母 GS115/*Anman5A* 中，涂布于 MD 平板上筛选双重重组毕赤酵母；将在 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含不同浓度 G418 的 YPD 平板上筛选抗高浓度 G418(2.0 mg/mL)的双重重组子。参照《分子克隆实验指南》中的方法[8]提取双重重组子的基因组 DNA。以此为模板，利用通用引物 5′-AOX 和 3′-AOX 进行 PCR 验证。

1.4 双重重组子的表达与分析

从筛选平板上挑取几个双重重组子按照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司)操作手册进行诱导表达。采用改良的 DNS 法，分别以 pH 3.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制的 5 g/L 角豆胶溶液为底物测定 β-甘露聚糖酶的活性[7]，以 pH 4.6 磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制的 5 g/L 桦木木聚糖溶液为底物测定木聚糖酶的活性[6]。以在测定的条件下，每分钟释放 1 μmol 还原糖所需的酶量定义为 1 个酶活单位。对不同重组子的产酶活性进行比较分析，并采用 SDS-PAGE 对表达产物进行分析及表观分子量的测定。

1.5 表达条件的初步优化

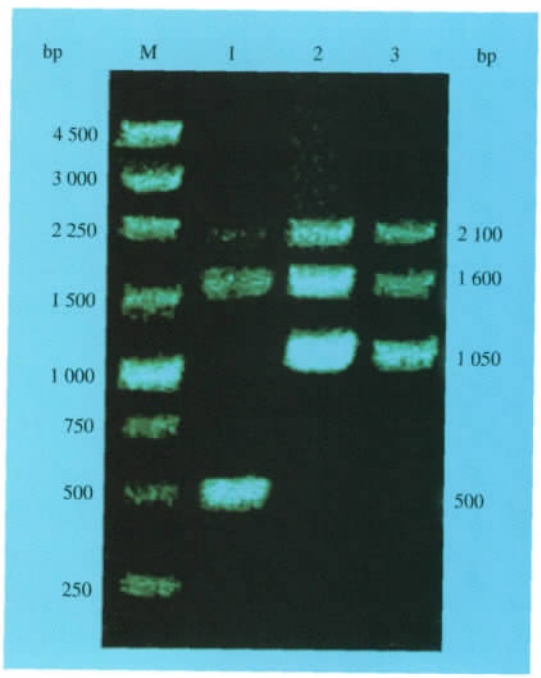
由于常规诱导表达方法的产酶活性不够理想，且流程较为复杂，因此本研究对表达的流程和条件均进行了适当的优化。本研究选用 YPD 作为种子培养基，2×BMGY 作为基础发酵培养基进行表达条件优化的研究。将工程菌接入 YPD 液体培养基中，于

30 ℃、220 r/min 的条件下培养 24 h，作为发酵用的种子液。将种子培养液以 8%的接种量接种于基础发酵培养基，在 30 ℃、220 r/min 下进行振荡培养，24 h 后添加所需浓度的甲醇，每 24 h 补加一次。对诱导时间、甘油添加量、培养基起始 pH 值、甲醇添加量进行单因素实验，初步优化了 GSMX2 菌株的表达条件。

2 结果与分析

2.1 双重重组子的 PCR 鉴定

以经 2.0 mg/mL G418 筛选后的双重重组子 GS115/*Anman5A-xyn* II 和 GS115/*Anman5A-9K* 的基因组为模板，进行 PCR 扩增鉴定，PCR 产物经 1 g/dL 琼脂糖凝胶电泳分析，GS115/*Anman5A-xyn* II 的 PCR 产物在 2.10 Kb，1.60 Kb，1.05 Kb 处可见 3 条清晰的条带，而 GS115/*Anman5A-9K* 的 PCR 产物的 3 条条带大小分别为 2.10 Kb，1.60 Kb，0.50，如图 1 所示。结果表明 *xyn* II 已成功整合入 GS115/*Anman5A* 基因组上，同时先前整合入的 *Anman5A* 也没有丢失。



M：250bp DNA ladder marker；1: GS115/*Anman5A-9K* PCR产物；2,3: GS115/*Anman5A-xyn* II PCR产物

图 1 GS115/*Anman5A-xyn* II 和 GS115/*Anman5A-9K* 的 PCR 验证

Fig.1 Identifications of the GS115/*Anman5A-xyn* II and GS115/*Anman5A-9K* by PCR

2.2 双重重组子的表达与产物分析

挑选 5 个 GS115/*Anman5A-xyn* II 菌落（分别命名为 GSMX1-GSMX5）和 1 个 GS115/*Anman5A-9K* 菌落（命名为 GSM9）进行常规诱导表达 96 h，8 000 r/min 离心 5 min 后收集上清液，取上清液用改良的 DNS 法测定 β-甘露聚糖酶活性和木聚糖酶活性，结果如表 1 所示。

表 1 GS115/Anman5A-xyn II 和 GS115/Anman5A-9K 的表达分析

Tab.1 Expression analysis of GS115/Anman5A-xyn II and GS115/Anman5A-9K

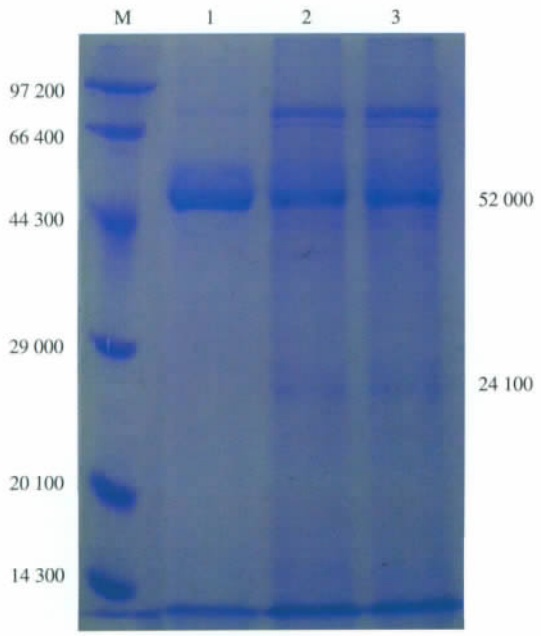
菌株	甘露聚糖酶活性/(U/mL)	木聚糖酶活性/(U/mL)
GSMX1	25.2	108.7
GSMX2	30.8	112.1
GSMX3	28.6	96.3
GSMX4	25.7	96.9
GSMX5	29.4	103.9
GSM9	45.6	0

由表 1 可知，GS115/*Anman5A-xyn* II 的表达产物同时具备了 β-甘露聚糖酶活性和木聚糖酶活性，其中 GSMX2 的产酶能力最强。GS115/*Anman5A-9K* 的产物只有 β-甘露聚糖酶活性，但它所产 β-甘露聚糖酶活性明显高于 GS115/*Anman5A-xyn* II，后者所产木聚糖酶的活性也明显低于 xyn II 单独在毕赤酵母中表达的水平[6]。这可能与毕赤酵母有限的分泌表达外源蛋白的能力有关[4]。

取 GSMX1、GSMX2 和 GSM9 的发酵上清液用 SDS-PAGE 进一步分析蛋白表达的情况，SDS-PAGE 的结果如图 2 所示。结果显示 GSMX1 和 GSMX2 的表达产物在约 24 100，52 000 处出现了明显的特异性条带，它们分别与前期测出的木聚糖酶[6]和 β-甘露聚糖酶[7]的表观分子量相符；而 GSM9 仅在 52 000 处有一条特异性条带，这与酶活测定的结果完全一致。

2.3 GSMX2 表达条件的初步优化

2.3.1 *诱导时间对产酶的影响* 将培养 24 h 后的 GSMX2 液体种子以体积分数 8%的接种量接种至起始 pH 6.0 的 2×BMGY 培养基，30℃、220 r/min 培养 24 h 后按 0.5%甲醇添加量进行诱导表达，诱导 144 h，期间每隔 12 h 取样进行酶活测定，产酶进程曲线如图 3 所示。



M: 低相对分子质量蛋白质Marker;
1: GSM9; 2: GSMX1; 3: GSMX2

图 2 表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig.2 SDS-PAGE analysis of expressed products

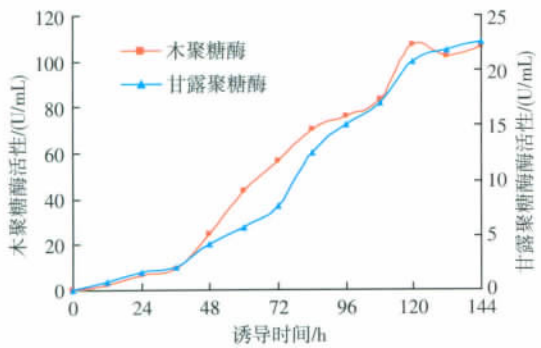


图 3 诱导时间对产酶的影响

Fig.3 Effect of induction time on the the expression of enzyme

由图 3 可知,诱导初期随着诱导时间的延长两种酶的活性逐渐增大，木聚糖酶活性在 120 h 时达到最大，而甘露聚糖酶的活性在 120 h 之后增长的趋势也相对变缓。因此,考虑到生产成本的节约及生产效率的提高,故选择 120 h 为最佳的诱导时间。

2.3.2 甘油添加量对产酶的影响 将培养 24 h 后的 GSMX2 液体种子以体积分数 8%的接种量接种至起始 pH 6.0 的分别含体积分数 0%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%甘油的发酵培养基，以体积分数 0.5%的甲醇添加量诱导培养 120 h 后取发酵上清液测酶活,结果如图 4 所示。

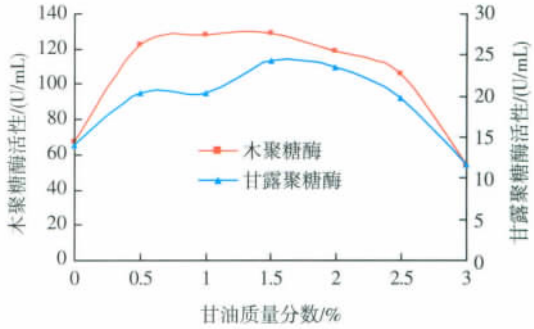


图 4 甘油质量分数对产酶的影响

Fig.4 Effect of glycerol concentration on the expression of enzyme

由图 4 可知,在一定范围内随着甘油浓度的增加两种酶酶活均逐渐增加,当甘油质量分数为 1.5%时两种酶活性最高,而当甘油浓度超过 1.5%后酶活反而呈现下降的趋势。这表明甘油在酵母培养期间作为菌体生长所需的碳源,若适当地提高甘油的浓度可以促进菌体的生长进而提高外源蛋白的表达量;然而,若甘油浓度过高也会对后期的诱导培养产生抑制作用,不利于外源蛋白的表达。

2.3.3 培养基起始 pH 对产酶的影响 在上述优化的基础上，研究了不同培养基起始 pH 对产酶的影响,结果如图 5 所示。

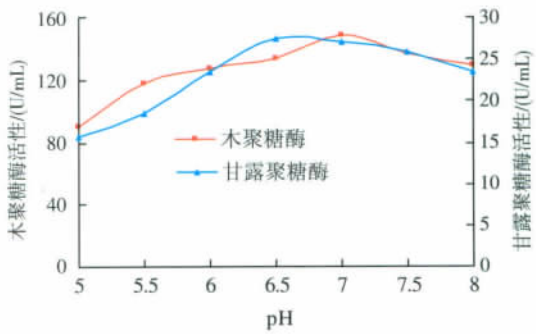


图 5 pH 值对产酶的影响

Fig.5 Effect of pH on the expression of enzyme

由图 5 可见，当培养基起始 pH 值为 7.0 时木聚糖酶的活性最高，而起始 pH 值为 6.5 时甘露聚糖酶的酶活性最高,并且在 pH 值在 6.5~7.5 时两种酶活性明显高于 pH 值 5.0~6.0 时,说明中性环境有利于这两种酶的生产。考虑到甘露聚糖酶在 pH 为 6.5 和 7.0 下的酶活值并没有太大差异,故选择起始 pH7.0 为最佳的起始 pH。

2.3.4 甲醇添加量对产酶的影响 在上述优化的基础上，继续研究了不同甲醇添加量对产酶的影响,结果如图 6 所示。

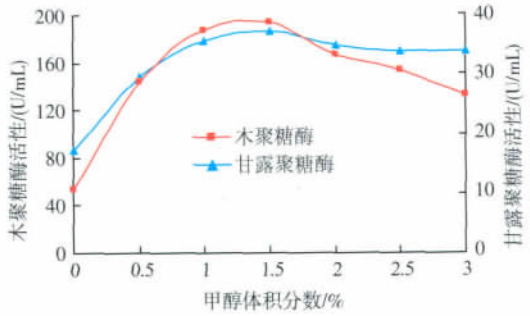


图 6　甲醇诱导量对产酶的影响

Fig.6　Effect of methanol concentration on the expression of enzyme

由图 6 可知，体积分数 1.5%的甲醇添加量诱导效果最佳。诱变表达期间，甲醇既是菌体生长所需的碳源又是诱导外源基因表达的诱导剂。过低的甲醇体积分数不足以充分诱导外源基因的表达，相反地，甲醇浓度过高会抑制宿主的生长，同样也不利于目的蛋白的表达[9]。

3 结　语

毕赤酵母表达系统是近年来发展较为迅速的真核表达系统，具有表达水平高、遗传稳定、可高密度发酵等许多优点，同时具备共表达多种蛋白的能力[10]。王慧[11]利用双质粒共表达体系（pPIC9K 和 pPICZαB）来提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母 GS115 中的表达量；高秋芳[12]将构建好的 pPIC9K-*xyn*2 和 pPIC9K-*Pel*C 同时转入毕赤酵母中，得到一株高效表达木聚糖酶和果胶裂解酶的菌株 PX6。利用双质粒体系在毕赤酵母中共表达多种酶是一项重要技术，它的发展为酶的合成提供了快速经济的途径。

在作者所在实验室已构建的工程菌的基础上，通过基因工程手段在毕赤酵母中实现了 β-甘露聚糖酶基因和木聚糖酶基因的共表达，并得到一株产 β-甘露聚糖酶和木聚糖酶活性高的重组菌株 GSMX2。随后对 GSMX2 菌株的产酶条件进行了初步优化，优化后 β-甘露聚糖酶和木聚糖酶的酶活分别从初始的 15.0 U/mL 和 75.8 U/mL 增加到了 37.1 U/mL 和 193.6 U/mL。本研究利用双质粒体系成功地构建出共表达产 β-甘露聚糖酶和木聚糖酶的工程菌 GS115/*Anman5A-xyn* II，同时探索出了较优的摇瓶发酵条件，对双质粒体系在共表达技术中的应用成功进行了有益探索，实现了目标酶的共同生产，可降低酶的制备成本，为进一步工业化生产复合酶奠定了基础。

参考文献：

[1] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanase: an overview of production and applications[J]. **Crit Rev Biotechnol**, 2007, 27: 197-216.

[2] Paës G, Berrin J G, Beaugrand J. GH11 xylanases: structure/function/properties relationships and applications[J]. **Biotechnol Adv**, 30(3): 564-592.

[3] Várnai A, Huikko L, Pere J, Siika-aho M, Viikari L. Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood[J]. **Biores Techno**, 2011, 102: 9096-9104.

[4] 吴振芳，唐自钟，陈惠，等. 毕赤酵母中植酸酶和内切葡聚糖酶共表达菌株的构建及其高效表达[J]. 生物工程学报，2010，26(5)：616-622.
WU Zhen-fang, TANG Zi-zhong, CHEN Hui, et al. Construction of a *Pichia pastoris* recombiant strain capable of over-expressing phytase and endoglucanase[J]. **Chinese Journal of Biotechnology**, 2010, 26(5): 616-622.(in Chinese)

[5] 周晨妍，符丹丹，朱劼，等. 宇佐美曲霉木聚糖酶基因的克隆与序列分析[J]. 食品与发酵工业，2005，31 (10)：29-32.
ZHOU Chen-yan, FU Dan-dan, ZHU Jie, et al. Cloning and sequence analysis of the gene encoding xylanase Xyn II from *Aspergillus usamii*[J]. **Food and Fermention Industries**, 2005, 31(10): 29-32.(in Chinese)

[6] 周晨妍，邬敏辰，李东峰，等. 宇佐美曲霉木聚糖酶基因 *xyn* II 在不同毕赤酵母中的分泌表达[J]. 生物加工过程，2008，6(2)：38-42.
ZHOU Chen-yan, WU Min-chen, LI Dong-feng, et al. Secreted expression of *Aspergillus usamii* xylanase gene in different *Pichia pastoris*[J]. **Chinese Journal of Bioprocess Engineering**, 2008, 6(2): 38-42.(in Chinese)

[7] Li J F, Zhao S G, Tang C D, et al. Cloning and functional expression of an acidophilic β-mannanase gene (*Anman5A*) from

Aspergillus niger LW-1 in *Pichia pastoris*[J]. **J Agric Food Chem**, 2012, 60: 765-773.

[8] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

[9] **唐存多，高金湖，邬敏辰. 人溶菌酶基因在毕赤酵母中的表达及发酵条件的优化**[J]. **中国生物制品学杂志**, 2010, 23(9): 953-956.
TANG Cun-duo, GAO Jin-hu, WU Min-chen. Expression of human lysozyme gene in *Pichia pastoris* and optimization of condition for fermentation[J]. **Chin J Biologicals**, 2010, 23(9): 953-956. (in Chinese)

[10] Daly R, Hearn M T W. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. **J Mol Recognit**, 2005, 18: 119-138.

[11] **王慧，窦文芳，张晓梅，等. 应用双质粒共表达体系提高融合蛋白 GGH 在毕赤酵母 GS115 中的表达量**[J]. **生物工程学报**, 2011, 27(7): 983-989.
WANG Hui, DOU Wen-fang, ZHANG Xiao-mei, et al. High-level expression of fusion protein GGH in *Pichia pastoris* GS115 by constructing a double plasmid co-expression system[J]. **Chin J Biotech**, 2011, 27(7): 983-989. (in Chinese)

[12] **高秋芳，郭安平，孔华等. 果胶裂解酶、木聚糖酶及果胶裂解酶、木聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达**[J]. **广东农业科学**, 2010, 37(8): 1-8.
GAO Qiu-fang, GUO An-ping, Kong Hua, et al. Expression of pectin lyase gene, xylanase gene, pectin lyase gene and xylanase gene in *Pichia pastoris*[J]. **Guangdong Agricultural Sciences**, 2010, 37(8): 1-8. (in Chinese)

会　议　信　息

会议名称(中文)： 第二届中国计算蛋白质组学研讨会
会议名称(英文)： The Second China Workshop on Computational Proteomics (CNCP-2012)
所属学科： 生物物理学、生物化学及分子生物学,细胞生物学,生物技术与生物工程
开始日期： 2012-11-14
结束日期： 2012-11-15
所在国家： 中华人民共和国
具体地点： 中科院计算所
主办单位： 中国科学院计算技术研究所和 CNHUPO
承办单位： 中国科学院计算技术研究所
联 系 人： 孙瑞祥
联系电话： 010-62601018
传　　真： 010-62601356
E-MAIL：rxsun@ict.ac.cn
会议网站： http://cncp.ict.ac.cn/2012/

会议背景介绍： 为了推动计算技术在中国的蛋白质组研究中发挥出更加切实的作用，更好地促进国内的学术交流，中国科学院计算技术研究所继 2010 年 11 月成功举办“首届中国计算蛋白质组学研讨会 CNCP-2010”(http://cncp.ict.ac.cn/2010/)之后，将于 2012 年 11 月联合中国人类蛋白质组组织 CNHUPO 举办"第二届中国计算蛋白质组学研讨会 CNCP-2012"。CNCP 的办会宗旨是学术优先、其他从简，办会方式是不征文、不收费、只设邀请报告、只设一个进程。CNCP-2012 报告人由 CNCP-2010 报告人推荐产生，其中 85%的报告人将首次参加 CNCP-2012，多数报告人都是非常年轻的学者，很多位报告人在 Cell、Nature、Science、The New England Journal of Medicine 等国际顶级期刊发表论文。我们相信，年轻的计算蛋白质组学将在 CNCP-2012 展现其年轻的风貌。